

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-332560

(43) 公開日 平成11年(1999)12月7日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号

F I

C 1 2 N 7/00

C 1 2 N 7/00

5/10

5/00

B

15/09

Z N A

15/00

Z N A A

// (C 1 2 N 7/00

C 1 2 R 1:92)

審査請求 未請求 請求項の数8 OL (全10頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-148789

(22) 出願日 平成10年(1998)5月29日

(71) 出願人 591235603

財団法人応用生化学研究所

岐阜県可児郡御嵩町御嵩字南山2193番地の  
128

(72) 発明者 小島 久典

岐阜県可児市下恵土235番地1号 橋本マ  
ンション 604号

(72) 発明者 八木 國夫

愛知県名古屋市長東区西里町2-21

(72) 発明者 大石 誠子

愛知県犬山市天神町1-17 しろひがしマ  
ンション1号棟305号

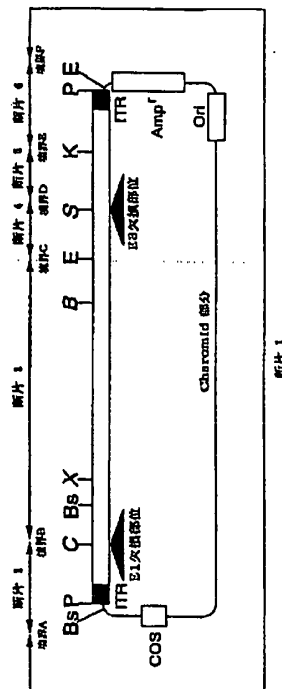
(74) 代理人 弁理士 佐々木 功 (外1名)

(54) 【発明の名称】 組換えアデノウイルス、該組換えウイルスゲノムを有しているコスミドベクター及び該組換えウイルスにより感染された動物細胞

(57) 【要約】

【課題】 組換えアデノウイルス、該組換えウイルスゲノムを有しているコスミドベクター及び該組換えウイルスにより感染された動物細胞を提供する。

【解決手段】 両端の逆方向末端繰り返し配列までを完全に含み且つ E1 及び E3 領域に欠損を有するアデノウイルス様ゲノムをコスミドベクターは内部に有しており、これらの欠損領域に外来遺伝子が挿入される。組換えウイルスゲノムの両端外側には制限酵素の認識切断部位が配されており、上記のコスミドベクターに該制限酵素を作用させれば組換えウイルスゲノムが遊離するので、これを動物細胞に感染させる。



BEST AVAILABLE COPY

(2)

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 両端の逆方向末端繰り返し配列までを完全に含み且つ E1 及び E3 領域に欠損を有するアデノウイルス様ゲノムを内部に有していることを特徴とする、コスミドベクター。

【請求項2】 アデノウイルス様ゲノム部分の両脇に、該アデノウイルス様ゲノム部分のみをコスミドベクターから遊離させる制限酵素認識部位を有していることを特徴とする、請求項1に記載のコスミドベクター。

【請求項3】 コスミドベクターを切断する他の制限酵素認識部位がアデノウイルス様ゲノムの E1 及び E3 欠損領域に、それぞれ存在していることを特徴とする、請求項1又は2に記載のコスミドベクター。

【請求項4】 アデノウイルス様ゲノムの左逆方向末端繰り返し配列よりも右側の部分又は右逆方向末端繰り返し配列よりも左側の部分に更に他の制限酵素認識部位を有しており、これによりアデノウイルス様ゲノムの修飾又は変更操作が容易になされていることを特徴とする、請求項1-3の何れか1つに記載のコスミドベクター。

【請求項5】 E1 及び E3 欠損領域にテトラサイクリン・トランスアクトベーターの発現単位及びテトラサイクリン・プロモーターに支配された外来遺伝子の発現単位をそれぞれ有していることを特徴とする、請求項3に記載のコスミドベクター。

【請求項6】 請求項1-4の何れか1つに記載のコスミドベクターが制限酵素により切断されて調製されたものであることを特徴とする、組換えアデノウイルス。

【請求項7】 テトラサイクリン・プロモーターの支配下にある遺伝子の発現がテトラサイクリンにより調節可能なことを特徴とする、請求項5に記載のコスミドベクターから調製された組換えアデノウイルス。

【請求項8】 請求項6又は7に記載の組換えアデノウイルスにより感染されていることを特徴とする、動物細胞。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は組換えアデノウイルス、該組換えウイルス遺伝子を有しているコスミドベクター及び該組換えウイルスにより感染された動物細胞に係り、本発明による組換えアデノウイルスは例えば遺伝子病の治療に応用することができる。

【0002】

【従来の技術及びその課題】従来、組換えアデノウイルスを調製するには基本となるアデノウイルス（通常は野生型）を培養細胞で大量に増殖させた後、そのウイルスの精製を行い、更に精製ウイルスから DNA を抽出する工程を必要としている。又、精製ウイルス DNA と大腸菌内で増殖させたプラスミド DNA との間での相同組換えを培養細胞の内部で生じさせる工程を必要としている。

2

従って、組換えアデノウイルスゲノムの複数箇所に外来遺伝子を導入したり或いは変更を加える必要がある場合には、中間体ウイルス（目的とする構造を有するウイルスの前段階のウイルス）の調製を行った後に、そのウイルスの DNA を精製する工程を経なければならず、多大の時間や労力を必要としている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題乃至発明の目的】従って、本発明の課題乃至目的は、従来の組換えアデノウイルス調製技術においては不可欠とされる野生型又は中間体アデノウイルスの増殖、精製及びウイルス DNA の抽出過程を必要とせず、更に精製ウイルスゲノム DNA と大腸菌内で増殖させたプラスミド DNA との間の相同組換え操作を不要にすることにある。

【0004】

【課題を解決し目的を達成するための手段】本発明によれば、既述の課題は、両端の逆方向末端繰り返し配列 (ITR :inverted terminal repeat) までを完全に含み且つ E1 及び E3 領域に欠損を有するアデノウイルス様ゲノムを内部に有していることを特徴とするコスミドベクターにより基本的には解決されると共に、上述の目的が達成される。

【0005】本発明によるコスミドベクターは、アデノウイルス様ゲノム部分の両脇に、該アデノウイルス様ゲノム部分のみをコスミドベクターから遊離させる制限酵素認識部位を有している。本発明によるコスミドベクターにおいて、該ベクターを切断する他の制限酵素認識部位がアデノウイルス様ゲノムの E1 及び E3 欠損領域に、それぞれ存在しており、これによって外来遺伝子の導入が可能になされているのが有利である。本発明によるコスミドベクターは、アデノウイルス様ゲノム左逆方向末端繰り返し配列よりも右側の部分又は右逆方向末端繰り返し配列よりも左側の部分に更に他の制限酵素認識部位を有しており、これによりアデノウイルス様ゲノムの修飾又は変更操作が可能になされているのが有利である。

【0006】本発明によるコスミドベクターにおいて、

例えば E1 及び E3 欠損領域にはテトラサイクリン・トランスアクトベーターの発現単位及びテトラサイクリン・プロモーターに支配された遺伝子の発現単位を導入することができる。このコスミドベクターを制限酵素により切断し、両端が共に逆方向末端繰り返し配列となっている構造になせば、該構造を有する DNA を組換えアデノウイルスが増殖可能な動物細胞に導入することで本発明による組換えアデノウイルスが得られ、この組換えアデノウイルスは動物細胞を感染させるために使用することができる。

【0007】

【発明の実施の形態】アデノウイルスは野生型の場合に約 36000 塩基対のサイズを有し、組換えアデノウイルス

(3)

3  
 スペクターもほぼそれに匹敵するサイズを有しているためにコスミドベクターを本発明は利用するものである。コスミドベクターを用いてアデノウイルス様ゲノムを大腸菌内部で安定に保持すると共に、増殖させるための使用技術は特開平 7 - 298877 号公報に開示されており、該組換えアデノウイルスの調製法も該公開公報に開示されている。そこで、本発明者等は両端の ITR をも完全に含んだアデノウイルス様遺伝子を別異のコスミドベクターで安定に保持すると同時に、該コスミドベクターを制限酵素処理を行うことにより、コスミドベクターからアデノウイルス様ゲノムのみを遊離させることを可能にした。この遊離された両端をも完全に含むアデノウイルス様ゲノムを組換えアデノウイルスが増殖可能な動物細胞、例えば 293 細胞に遺伝子導入することにより容易に組換えアデノウイルスを得ることができる。更に、本発明によるコスミドベクターは外来遺伝子を導入したり、組換えアデノウイルスの基本的骨格に改変を加えるのを容易にするために、複数の制限酵素認識部位を有するように構築されている。

【0008】次に、本発明によるコスミドベクターの構造に関連して説明する。

#### アデノウイルス様ゲノム部分の構造

本発明によるコスミドベクターは後記のように幾つかの断片から構成されており、特開平 7 - 298877 号公報に開示されている Axlc (又は Axlw) から派生した Axlcw に由来するものである (Axlcw は理研ジーンバンクから入手することができる)。この新たに作成したコスミドベクターを、以下、「pacad1A」と称する。このコスミドベクターである pacad1A の概要は図 1 に示されている。pacad1A は 6 つの断片から構成されており、断片 1 を基本骨格とし、それに断片 2 - 6 が結合して 1\*

4  
 \* つのプラスミドを形成している形態のものである。この pacad1A は、それを組換えアデノウイルス作成に使用する際の遺伝子操作上、4つの部分に分けて使用される。即ち、第 1 部分はアデノウイルス様ゲノムの左側部分 (図 1 において Bs - Bs により挟まれた領域) であって、完全な左 ITR を包含し、パッケージング配列及び E1 遺伝子領域 (1.3% から 9.3% 欠失させ、その部位に外来遺伝子の導入目的で ClaI による認識切断部位が作成されている) を主として含むものである。第 2 部分はアデノウイルス様ゲノムの右側部分 (図 1 において E - E により挟まれた領域) であって、完全な右 ITR を包含し、E3 遺伝子領域 (79.6% から 84.8% 欠失させ、その部位に外来遺伝子の導入目的で SmaI による認識切断部位が作成されている) 及び E4 遺伝子領域を主として含むものである。第 3 部分はアデノウイルス様ゲノムの中間部分であって、上記の左及び右側部分以外のウイルス遺伝子部分である。最後の第 4 部分はアデノウイルス様ゲノム以外の部分であって、本例の場合はコスミドベクターの 1 つである charomid の部分である。これらの各部分は幾つかの断片或いは断片の一部から構成される。下記の表 1 に各断片の由来が明らかにされているが、pacad1A は直接的に Axlcw に由来する部分と、AxRSV-LacZ ウイルス [H. Kojima 等 "Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol. 207, pages 8 - 12, (1995年)] のゲノム DNA を鋳型として合成 DNA であるプライマーを用いて PCR[polymerase chain reaction (ポリメラーゼ連鎖反応)] により増幅合成した断片から構成されている。

【0009】

【表 1】

断片番号	断片両端認識用制限酵素名	由 来
1	EcoRI と Bst1107I	Axlcw の charomid 部分 (charomid 9-11 由来)
2	Bst1107I と ClaI	AxRSV-LacZ 由来 (PCR産物)
3	ClaI と EcoRI	Axlcw のウイルス遺伝子部分
4	EcoRI と SmaI	AxRSV-LacZ 由来 (PCR産物)
5	SmaI と KpnI	Axlcw のウイルスゲノム部分
6	KpnI と EcoRI	AxRSV-LacZ 由来 (PCR産物)

【0010】charomid 部分

コスミドベクターとして大腸菌内で増殖させたり、λファージにパッケージさせたりするために必要な骨格部分

の構造に関する課題を解決するために、本発明者等は pacad1A には斉藤等により開示されている charomid 9-11 [I. Saito 等 "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A", Vol.

(4)

5

83, pages 8664 - 8668, (1986年)]のポリリンカー部分(制限酵素の EcoRI 及び HindIII による認識切断部分)を取り除いたものを使用した。

#### 【0011】各断片の境界部分の構造

図1に示されている pacad1A を構成する各断片の境界部分における塩基構造は図2 - 図7に示されている。ポリリンカー部分を取り除いた charomid 9-11とアデノウイルス様ゲノムとの境界部分は、図2に示されているように、左側部分は charomid 側から HindIII-Bst1107I-PacI の順番に制限酵素認識部位が並び、次いでアデノウイルス様ゲノムの左 ITR 部分に至っており、一方右側部分は、図7に示されているように、アデノウイルス様ゲノムの右 ITR 部分に引き続いて PacI-EcoRI の順番で制限酵素認識部位が並び、次いで charomid 部分に至る構造を有している。本発明において使用される pacad1A には、このような制限酵素認識部位が配置されているので、制限酵素である PacI にて処理することによりアデノウイルス様ゲノム部分のみを一体として charomid 部分から遊離させることが可能である。尚、Bst1107I や EcoRI を利用すると、アデノウイルス様ゲノムにおける左端部や右端部を選択的に遊離させることが可能であり、従ってアデノウイルスの該部位の修飾や変更の場合における処理操作が容易である。

#### 【0012】コスミドベクターの組換え

pacad1A に外来 DNA 断片を挿入又は pacad1A の1部分を外来 DNA で置換する目的で、予め制限酵素にて pacad1A を処理した(目的によっては Klenow fragment 等による処理を追加した)後、挿入又は置換用の DNA 断片と共にライゲーション反応を行う。引き続き、Giga pack in vitro packaging kit(Stratagene 社)を使用して、λファージにコスミド DNA をパッケージすることによって組換えファージを作成する。この組換えファージで適当な大腸菌(例えば DH5α)を感染させ、アンピシリン含有 LB 寒天培地に一晚 37℃ にてインキュベーションする。出現したコロニーを各々別個に採取し、1.5mlのアンピシリン含有 LB 培地に一晚 37℃ にて振盪培養する。この LB 培地に含まれる大腸菌からコスミドベクター由来の DNA を抽出し(ミニプレップ操作)、抽出した DNA を適当な制限酵素にて処理することにより目的の構造を有するクローンを単離する。

#### 【0013】アデノウイルス様遺伝子の遊離及び精製

目的の構造を有する pacad1A 誘導体クローンの DNA を大量に精製するためには、先ず 1.5mlの LB 培地から抽出して得られた DNA を再び Giga pack in vitro packaging kit を使用して、λ-ファージ内にパッケージすることにより組換えファージを作成する。この組換えファージで適当な大腸菌(DH5α)を感染させ、アンピシリンを含有する適当な量(50 - 200ml)の LB 培地内で一晚 37℃ にて振盪培養を行う。この LB 培地から、QIAGEN カラム(QIAGEN 社)を利用し又は CsCl による濃度密

6

度勾配超遠心法を利用して DNA を抽出し、精製する。得られた DNA の内の適当量を採取して PacI (New England Biolabs 社)にて制限酵素処理を行う。PacI による処理を行った後に、除蛋白の目的でフェノール/クロロホルム処理と遠心処理を行う。得られた上清に含まれている DNA を更に精製する目的でエタノールによる沈澱処理を行った後、更にその沈澱(DNA)を 70% エタノールを用いて一度リンスする。リンスした DNA については滅菌蒸留水に溶解して DNA 濃度を測定し、その後は動物細胞である 293 細胞への遺伝子導入操作を行うまで凍結保存する。

#### 【0014】アデノウイルス様ゲノム DNA の 293細胞への導入

上記の工程で得られたアデノウイルス様ゲノム DNA を 10μg 含有する 600μl の Opti-MEM 液(Gibco 社)と 80μl の Lipofectamine reagent (Gibco社)を含有する 600μl の Opti-MEM 液とを混和させ、次いで室温にて 30 分間静置する。その後、この混和液に更に 7ml の Opti-MEM 液を添加する。この溶液を、予め用意した 293 細胞 [ATCC より入手(コラーゲンにてコートされた面積 75cm<sup>2</sup> のフラスコ 1 個分)]の培養液と置換し、37℃、5% CO<sub>2</sub> の環境下(CO<sub>2</sub> インキュベーター内)にてインキュベーションを行う。次いで、DNA 含有混和液を新鮮な細胞培養液と完全に置換し、更に終夜 37℃、5% CO<sub>2</sub> の環境下(CO<sub>2</sub> インキュベーター内)にてインキュベーションする。上記の遺伝子導入操作を行った日の翌日、293 細胞をフラスコから遊離させて浮遊液とし、コラーゲンにてコートされた 96 穴プレート 1 枚に播き、組換えウイルスの出現・増殖を待つ。

#### 【0015】組換えアデノウイルスの単離

通常、遺伝子導入操作から 14 日間にわたり 293 細胞を維持すれば、新しく生成した組換えアデノウイルスが 293 細胞内で増殖して、293 細胞を死滅させる細胞障害効果(cytopathic effect)が観察されるので、ウイルスの生成したwellの判別を行うことができる。その well からウイルスを含有している死滅細胞と培養液の凍結保存を行う。この保存液の一部分で新鮮な 293 細胞を感染させ、死滅細胞からゲノム DNA の抽出を行う。得られた DNA を幾つかの制限酵素で処理した後、アガロースゲルによる電気泳動で、その切断パターンを確認する。叙上の操作により目的の構造を有するウイルスクローンを大量に増殖させた後に精製処理する。

#### 【0016】本発明の特徴

本発明を従来の方法と対比して、その特徴を明確化すると(1)通常、組換えアデノウイルスの生成は 293 細胞内での 2 種類の異なった DNA 分子間での相同組換えに依存するが、本発明ではこの工程が不要であり、従って(2)生成され出現してくる組換えアデノウイルスは目的以外の構造を有している可能性が極めて低く、又(3)従来法では 2 種類の異なった DNA 分子のうち片方の

(5)

7  
DNA が大量増殖及び精製したウイルス粒子から抽出されたものであるために、その調製には比較的多大な時間及び労力並びに特定の施設や機器が必要とされるが、本発明においては pacad1A 及びその誘導体はコスミドベクターであるために、大腸菌内部で増殖させる工程のみであり、従って簡便且つ容易に組換えアデノウイルスの大量調製を行うことができ、(4) pacad1A はコスミドベクターの形態を有しているために、λファージ及び大腸菌によるアデノウイルス様ゲノムの安定保持が可能であり、更に (5) pacad1A 内部のアデノウイルス様ゲノム部分には、該ゲノムを修飾する際に要求される複雑な操作を簡素化するために種々の制限酵素 (ClaI, Bst1107I, XbaI, BamHI, EcoRI, SmaI 及び KpnI - 図 1 参照) の認識部位が用意されており、従って新しい世代の組換えアデノウイルスベクターの作成や複雑な機能を有する組換えアデノウイルスベクターの作成に利用することができる。

【0017】

【実施例等】次に、実施例及び試験例により本発明を更に詳細に且つ具体的に説明するが、この実施例は本発明適用の単なる 1 例に過ぎないことに留意され度い。

**実施例** (テトラサイクリンによる遺伝子発現の調節が単一のベクターで可能な組換えアデノウイルスの作成)

このタイプの組換えアデノウイルスの作成は、大別して 4 つの段階に分けて実施することができ、その概要が図 8 に示されている。これらの内で段階 1 及び 2 はコスミドベクターへの発現単位の挿入のための組換え操作に関するものであり、段階 3 は両端における ITR 部分 (図 1 参照) を完全に包含するアデノウイルス様ゲノム DNA の遊離および精製操作に関するものであり、段階 4 は該 DNA の 293 細胞への導入操作と出現ウイルスの単離操作に関するものである。

【0018】上記の段階の中で、段階 1 及び 2 はそれぞれ下記の諸工程を包含している。

(a) 制限酵素によるコスミドベクターの処理及び得られた DNA 断片の精製工程、(b) 導入又は置換する DNA 断片の精製工程、(c) 両 DNA 断片のライゲーション反応工程、(d) in vitro packaging 反応及び得られた組換え λファージにより大腸菌 (DH5α) を感染させる工程、(e) アンピシリン耐性大腸菌からのコスミド DNA の抽出と該 DNA の構造を確認する工程、及び (f) 目的の構造を有するクローン由来のアデノウイルス様ゲノム DNA を大量に調製する工程。

【0019】段階 1 及び 2 (pacad1A への発現単位の挿入工程) : 先ず、SV40 ウイルスのラージ T 蛋白質由来の核移行シグナルを含むテトラサイクリン・トランスアクチベーター遺伝子 (特開平 10 - 80274 号公報に開示されている NtTA 遺伝子) を CAG プロモーター (特開平 3 - 168087 号公報に開示されている) の下流に配置されたテトラサイクリン・トランスアクチベーター発

8  
現単位 (特開平 10 - 80274 号公報に開示されている pCANTTA プラスミド由来のもの) を ClaI (宝酒造株式会社) にて切り出し精製した。次に、pacad1A を ClaI にて処理した後、その NtTA 遺伝子発現単位と共にライゲーション反応を行い、GigapackIII Gold kit (Stratagene 社) を用いて λファージに in vitro packaging した。この λファージで大腸菌 (DH5α) を感染させ、アンピシリン含有 LB 寒天培地に播き、37℃ にて一晚インキュベーションした。翌日、新たに出現したコロニーから DNA を抽出し、Bst1107I と SpeI による制限処理を通じて構造の確認を行い、目的の構造を有するクローン (pacadCANT) を得た (上記の諸操作が段階 1 であり、得られた pacadCANT には NtTA 発現単位が右向きに導入されている)。

【0020】次に、GigapackIII Gold kit を使用して in vitro packaging により上記の pacadCANT で大腸菌 (DH5α) を感染させた。この λファージ感染大腸菌をアンピシリン含有 LB 培地にて終夜培養して増殖させた。この培養液から pacadCANTDNA の大量精製を QIAGEN カラムを利用して行った。得られた DNA の一部を採取して SmaI (ベーリンガー・マンハイム社) にて制限処理を行い、これにより生成した DNA 断片を精製した。これに、テトラサイクリン・プロモーター [M.Gossen 等 "Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.", Vol. 89, pages 5547 - 5551 (1992 年)] の下流にピッカジーンプロモーターベクター 2 プラスミド (東洋インキ株式会社) 由来のホタルルシフェラーゼ遺伝子および SV40 由来の後期ポリ阿德ニレーションシグナル配列を配置させたルシフェラーゼ発現単位を含む DNA断片を添加してライゲーション反応を行った。このライゲーション液について GigapackIII Gold kit (Stratagene 社) を用いて λファージに in vitro packaging した。この λファージで大腸菌 (DH5α) を感染させ、アンピシリン含有 LB 寒天培地に播き、37℃ にて一晚インキュベーションした。翌日、新たに出現したコロニーから DNA を抽出して構造を確認した。目的の構造 (テトラサイクリン・プロモーターにて支配されるルシフェラーゼ発現単位を SmaI による pacadCANT の切断部位に左向きに有している) を有するクローンを得、このクローンを「pacadCANTT-luc」と命名すると共に、その DNA の大量調製及び精製を QIAGEN カラムを利用して行った。この DNA を TE 液 [10 mM Tris HCl (pH 8.0) + 1 mM EDTA 液] に溶解し、DNA 濃度を測定した後に凍結保存した (上記の諸操作が段階 2 である)。

【0021】段階 3 (アデノウイルス様ゲノム DNA の遊離および精製) : 100 μg の pacadCANTT-luc DNA を 40 μl の PacI [4000U/ml (New EnglandBioLabs 社) にて 2 時間処理した。その後、フェノール/クロロホルム処理を 1 回及びクロロホルム処理を 2 回行い、次いでエタノールによる沈澱処理を行った。沈澱した DNA

(6)

9

を 70% エタノールにてリンスし、210 $\mu$ l の滅菌蒸留水に溶解した。この DNA 溶液の中で 10 $\mu$ l を採取して DNA 濃度の測定を行い、残余を凍結保存した。

【0022】段階 4 の前段 (293 細胞へのアデノウイルス様ゲノム DNA 導入) : 段階 3 において得られ且つ濃度が判明した DNA であって 10 $\mu$ g の DNA を含有する量の DNA を凍結保存分から採取して 600 $\mu$ l の Opti-MEM 液に溶解し、80 $\mu$ l の Lipofectamine を含有する 600 $\mu$ l の Opti-MEM 液と混和した。次いで、室温において 30 分間静置した後に更に 7ml の Opti-MEM 液を添加してアデノウイルス様ゲノム導入用の DNA-Lipofectamine 混和液とした。コラーゲンにてコートされた面積 75cm<sup>2</sup> のフラスコに予め用意した 293 細胞培養液 (細胞集密度 : 80%) から培養液 (10% FBS 含有 DMEM 培養液) を除去し、5ml の Opti-MEM 液により細胞を軽くリンスした。その後、Opti-MEM リンス液を除去し、これを上記のゲノム導入用混和液と置換し、37℃、5% CO<sub>2</sub> の条件下にて CO<sub>2</sub> インキュベーター内で細胞を 4 時間インキュベーションした。次いで、ゲノム導入用の DNA-Lipofectamine 混和液を新鮮な培養液 (10% FBS 含有 DMEM 液) に置換し、更に上記と同様の条件で終夜インキュベーションした。翌日、遺伝子導入処理を施した 293 細胞をフラスコから遊離させ、10% FBS 含有 DMEM 液を用いて細胞浮游液となした。この細胞浮游液をコラーゲンにてコートされた 96 穴プレートに播き、37℃、5% CO<sub>2</sub> の条件下に維持した。

【0023】段階 4 の後段 (組換えアデノウイルスの単離及び構造確認) : 独立して 2 回行った遺伝子導入操作の結果、遺伝子導入処理から 7 - 14 日後に 16 乃至 21 個の well においてウイルスによる細胞障害効果が観察された (後記の表 2 における遺伝子導入例 A 及び B 参照)。ウイルスによる細胞障害効果が観察された well の細胞と培養液の両者を、各々別個に滅菌チューブ \*

10

\* に採取して凍結保存した。遺伝子導入処理後 14 日間にもわたり細胞を維持した段階で、細胞障害効果の認められた全ての well 由来のもの (死滅細胞 + 培養液) について、ドライアイス・エタノールと 37℃ のウォーターバスを用いて 5 回の急速凍結と融解とを繰返した後に遠心処理を行って、ウイルスを含有する上清を回収した。この上清の一部で新鮮な 293 細胞 (24 穴プレートに播種) を感染させ、完全に細胞障害効果が出現した時点で死滅細胞を回収し、該細胞から DNA を抽出した。この DNA を幾つかの制限酵素で処理することにより構造の確認を行った。図 9 には遺伝子導入例 A の場合に得られたウイルス由来の DNA を SphI で処理した例 (16 例) が示されている。得られたすべてのウイルスは制限酵素 SphI を用いて処理する場合に図 10 に示されているようなサイズの DNA 断片を遊離することが予想されるが、遺伝子導入例 A の場合には得られた 16 wells のウイルスすべてが同一の且つ予想された構造を有していることが判明した (この新たに得られた組換えアデノウイルスを「AcNTT-luc」と命名した)。これにより、本発明による組換えアデノウイルスの調製過程においては、従来の方法と比較する場合に、E1 陽性ウイルス等の望まぬウイルスが出現する確率の極めて低いことが証明された。尚、PacI にて処理していない pacadCANTT-luc についても PacI 処理を行った pacadCANTT-luc と同様の条件で遺伝子導入を行ったが (後記の表 2 における遺伝子導入例 C、D、E 及び F)、293 細胞に対する障害効果は認められず、従ってウイルスの生成には pacadCANTT-luc を PacI により処理して両端に ITR を完全に含むアデノウイルス様ゲノム DNA の遊離が必要であることが判明した。

【0024】

【表 2】

遺伝子導入例 (DNA の形態)	陽性 well の数
(A) PacI 消化の線状 DNA	16
(B) PacI 消化の線状 DNA	21
(C) PacI 未消化の環状 DNA	0
(D) PacI 未消化の環状 DNA	0
(E) PacI 未消化の環状 DNA	0
(F) PacI 未消化の環状 DNA	0

表 2 中において「陽性 well の数」とは、293 細胞に対してウイルスによる細胞傷害効果が観察された well の数の総計である。

【0025】試験例 (AcNTT-luc 組換えアデノウイルスベクターの機能に関する評価)

本発明による AcNTT-luc ウイルスベクターはそのゲノ

ム上の別々の箇所 (E1 欠損部位及び E3 欠損部位) に異なる遺伝子発現単位を有している。E3 欠損部位に導入されたテトラサイクリン・プロモーターの支配下のルシフェラーゼ遺伝子が発現するためには、E1 欠損部位に導入された NtTA 遺伝子の発現が必要であり、更にその発現はテトラサイクリンを培養系に加えることにより阻

(7)

11

害できるようにデザインされている。従って、別々の箇所に導入された遺伝子が両者共に機能するかどうかを調べる目的で、CHO-K1 細胞 (ATCC より供与を受けた) に AcNTT-luc ウイルスを感染させ [感染重複度 (multiplicity of infection) : 1]、培養液中のテトラサイクリンの濃度を変化させて、ルシフェラーゼ遺伝子の発現を調べた。結果は下記の表 3 に示されている通りであり、テトラサイクリン不在の場合には高いルシフェラーゼ活性が認められる一方、テトラサイクリンが存在する場合にはその濃度上昇に従って活性が減少し、1  $\mu\text{g/ml}$  のテトラサイクリンが存在する場合には不在の場合の 1000 分の 1 にまで活性が低下した。これらの結果から、本発明による組換えアデノウイルスは動物細胞に感染し、\*

12

\* 細胞内部に侵入した該ウイルスから、即ち、そのゲノム上の別々の箇所に存在する異なる遺伝子発現単位から目的の遺伝子産物 (蛋白質) が発現する機能を有することが確認された。このことは、AcNTT-luc の場合に、E3 欠損部位に導入されたテトラサイクリン・プロモーターの支配下にある外来遺伝子の発現が E1 欠損部位に導入された NtTA 遺伝子の発現により誘導され、更に該誘導はテトラサイクリンを培養系に加えることにより阻害できるという発現調節機能を有していることの証左に他ならないのである。

【0026】

【表3】

培養液中のテトラサイクリン濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	ルシフェラーゼ活性 (*) (Relative Light Unit $\times 10^4$ )
<b>AcNTT-luc 感染 CHO-K1 細胞</b>	
0	1733.6 $\pm$ 85.7
0.01	276.9 $\pm$ 51.2
0.1	19.6 $\pm$ 5.3
1	1.2 $\pm$ 0.3
10	1.0 $\pm$ 0.1
100	0.9 $\pm$ 0.1
<b>非感染 CHO-K1 細胞</b>	
0	0.3

表 3 中において、\* : 平均値  $\pm$  標準偏差

#### 【0027】本発明による組換えアデノウイルスベクターと従来の組換えアデノウイルスとの比較

本発明による組換えアデノウイルスの特徴、即ちアデノウイルス様ゲノム内に導入された (テトラサイクリン・プロモーターの支配下にある) 外来遺伝子の発現が、単一のアデノウイルス様ゲノムの別部位に導入された NtTA 遺伝子の発現により誘導され、該誘導がテトラサイクリンを培養系に加えることにより阻害できるという発現調節機能を有するタイプの組換えアデノウイルスの特徴を、従来の組換えアデノウイルスと比較して明確にする。従来の組換えアデノウイルスを用いて外来遺伝子を動物細胞に導入した場合には、該外来遺伝子の発現は通常恒常的で、外部からのコントロールは不可能な場合が多く、又発現の調節が可能な場合においても、目的とする導入遺伝子の発現量自体が乏しかったり或いはその誘導又は抑制の度合いが乏しかったりして有用性が低かったのが実状である。これに対して、Gossen 等が開発し [Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 89, pages 5547 - 5551 頁 (1992 年)], 濱田等が改良を加えた (特開平 10 - 80274 号公報)、テトラサイクリンにて導入遺伝子の発現量をコントロールできるシ

ステムは極めて有用な系である。この系の組換えアデノウイルスベクターへの応用は既になされているが、単一のアデノウイルスベクターにおける別々の部位 (E1 及び E3 欠損部位) にテトラサイクリン・トランスアクチベーターの発現単位及びテトラサイクリン・プロモーターの支配下におかれた外来導入遺伝子の発現単位をそれぞれ有する組換えアデノウイルスは本発明が初めてである。単一のアデノウイルスにテトラサイクリン・トランスアクチベーターの発現単位およびテトラサイクリン・プロモーターの支配下におかれた外来導入遺伝子の発現単位の両者を導入することにより、本発明においては複数のウイルスを調製し、取り扱うと云う手間が省ける以外に、1 個のウイルスが動物細胞内に侵入すれば、目的とする外来導入遺伝子の発現調節が可能になると云う利点を有している。更に、試験例の表 3 において示されているように、このタイプの組換えアデノウイルスを用いれば、少なくとも 1000 倍の遺伝子発現誘導 (又は発現抑制) が可能である。このような発現調節機能を有する本発明の組換えアデノウイルスは、遺伝子治療の目的に使用する場合や、細胞や生体が有している生理活性物質の機能に関する解析に応用する場合に極めて有用

(8)

13

な手段となる。

【0028】

【発明の効果】アデノウイルス様ゲノムを有する本発明によるコスミドベクターを用いれば、従来複数の部位に対する複雑な操作過程を必要とされてきたアデノウイルスの遺伝子の修飾、変更、外来遺伝子の導入等の操作を簡便に行うことができる。又、その際にアデノウイルスの大量調製や、そのゲノム DNA の大量調製を必要としないので、時間や労力を大幅に節減することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明において使用された組換えコスミドベクターである pacad1A の構造の概要を示す図であり、本図中において

E1 欠損部位：アデノウイルスの初期発現領域 (early region) 1 の欠損部位、

E3 欠損部位：アデノウイルスの初期発現領域 3 の欠損部位、

COS：本コスミドベクターを入ファージにパッケージングする際に必須の部分、

Ori：大腸菌内でのプラスミドの複製起点であって、大腸菌内で本コスミドベクターが増幅される機能を果たす部分、

Amp<sup>r</sup>：本コスミドベクターにより形質転換された大腸菌に抗生物質であるアンピシリンに対する耐性を付与するための遺伝子部分、

ITR：アデノウイルスゲノムの両端に存在する逆方向末端繰り返し配列部分、

Bs：制限酵素である Bst1107I による認識切断部位、

P：制限酵素である PaeI による認識切断部位、

C：制限酵素である ClaI による認識切断部位、

X：制限酵素である XbaI による認識切断部位、

B：制限酵素である BamHI による認識切断部位、

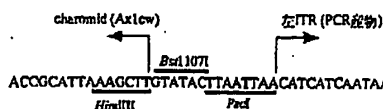
E：制限酵素である EcoRI による認識切断部位、

S：制限酵素である SmaI による認識切断部位、

K：制限酵素である KpnI による認識切断部位を意味し、イタリック体で略記された制限酵素 (C, X, B 及び S) は、これらの制限酵素が認識して本コスミドベクターを切断する箇所が 1 箇所のみであることを意味している。

【図2】図1に示されたコスミドベクターである paca 40

【図2】



14

d1A を構成する断片 1 と 2 との境界 A 部分の塩基配列と、該境界部分における塩基配列を認識してベクターを切断可能な制限酵素とを示す図。

【図3】図1に示されたコスミドベクターである paca d1A を構成する断片 2 と 3 との境界 B 部分の塩基配列と、該境界部分における塩基配列を認識してベクターを切断可能な制限酵素とを示す図。

【図4】図1に示されたコスミドベクターである paca d1A を構成する断片 3 と 4 との境界 C 部分の塩基配列と、該境界部分における塩基配列を認識してベクターを切断可能な制限酵素とを示す図。

【図5】図1に示されたコスミドベクターである paca d1A を構成する断片 4 と 5 との境界 D 部分の塩基配列と、該境界部分における塩基配列を認識してベクターを切断可能な制限酵素とを示す図。

【図6】図1に示されたコスミドベクターである paca d1A を構成する断片 5 と 6 との境界 E 部分の塩基配列と、該境界部分における塩基配列を認識してベクターを切断可能な制限酵素とを示す図。

【図7】図1に示されたコスミドベクターである paca d1A を構成する断片 6 と 7 との境界 F 部分の塩基配列と、該境界部分における塩基配列を認識してベクターを切断可能な制限酵素とを示す図。

【図8】テトラサイクリンによる遺伝子発現の調節が単一のベクターで可能な組換えアデノウイルス、該ウイルスによる動物細胞の感染及び該動物細胞の培養によるウイルスの発現を示す図。

【図9】実施例における遺伝子導入例 A において得た 16 wells の組換えアデノウイルス由来 DNA を制限酵素の SphI で処理し、アガロースゲルによる電気泳動を行って調べた切断パターンを示すものであり、M はマーカーのレーンを示し、図の左側に、マーカーによって指示される DNA のサイズ (塩基対の数) が数字で示されている。

【図10】目的とされる AcNTT-luc が示すものと想定される SphI による組換えアデノウイルス遺伝子 DNA の切断パターンを示すものであり、各数字は SphI による消化にて遊離してくる DNA 断片のサイズ (塩基対の数) を示している。

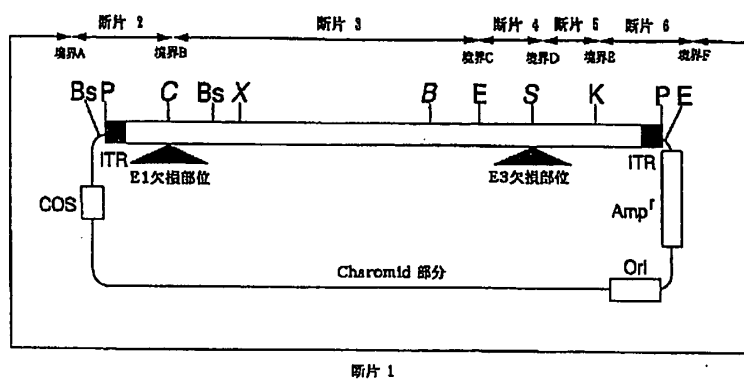
【図3】



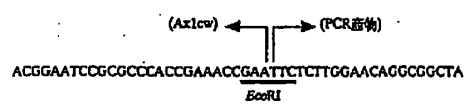


(9)

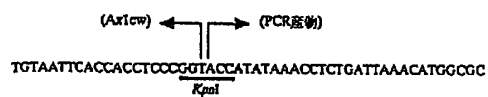
【図1】



【図4】



【図6】



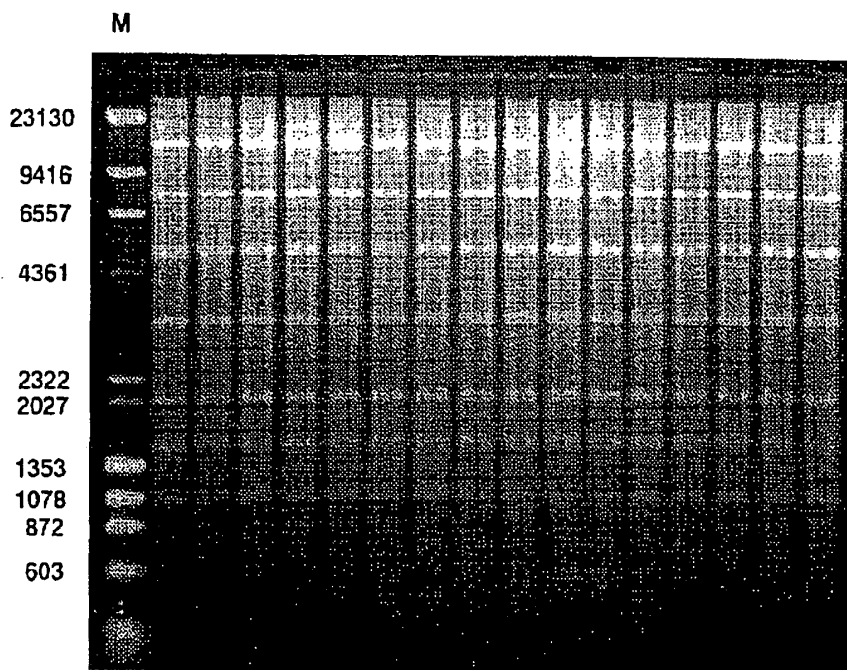
【図5】



【図7】

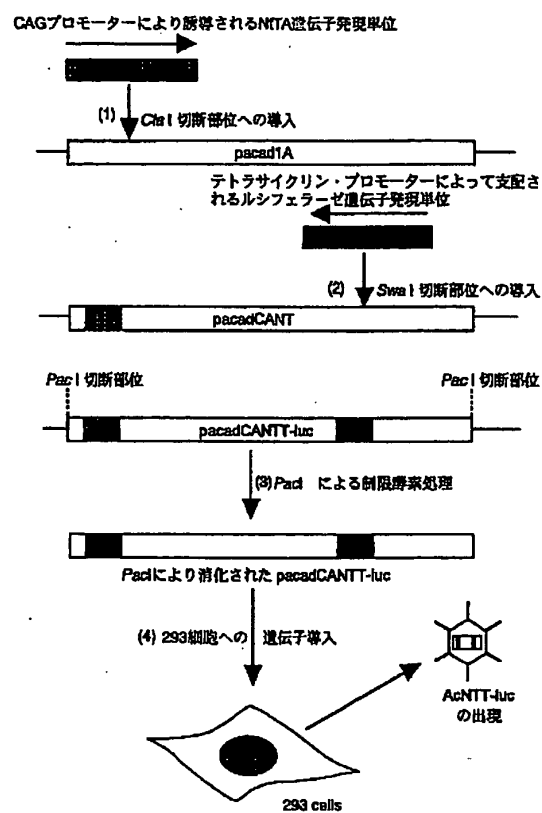


【図9】

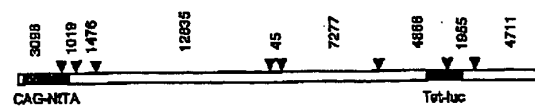


(10)

【図8】



【図10】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>  
 (C 1 2 N 15/09  
 C 1 2 R 1:92)

識別記号  
 ZNA

F I

Partial English Translation of

JP 11-332560 A

[Title of the Invention]

RECOMBINANT ADENOVIRUS, COSMID VECTOR HAVING THE RECOMBINANT  
VIRAL GENOME AND ANIMAL CELL INFECTED WITH THE RECOMBINANT  
VIRUS

[Abstract]

[Problem to be Solved]

To provide a recombinant adenovirus, a cosmid vector  
having the recombinant viral genome, and an animal cell  
infected with the recombinant virus.

[Solution]

The cosmid vector comprises an adenovirus-like genome  
having complete inverted terminal repeats at both terminals  
and having a deletion in E1 and E3 regions into which foreign  
genes are to be inserted. Restriction enzyme recognition and  
digestion sites are arranged outside the both terminals of  
the recombinant viral genome. The recombinant viral genome  
is isolated by treating the cosmid vector with the restriction  
enzymes, and an animal cell is infected with the genome.

[Scope of Claim for a Patent]

[Claim 1]

A cosmid vector characterized by comprising an adenovirus-like genome having complete inverted terminal repeats at both terminals and having a deletion in E1 and E3 regions.

[Claim 2]

The cosmid vector according to claim 1, characterized by comprising restriction enzyme recognition sites on both sides of the adenovirus-like genome portion for isolating the adenovirus-like genome portion from the cosmid vector.

[Claim 3]

The cosmid vector according to claim 1 or 2, characterized in that other restriction enzyme recognition sites for digesting the cosmid vector are present in the E1 and E3 deletion regions of the adenovirus-like genome, respectively.

[Claim 4]

The cosmid vector according to any one of claims 1 to 3, characterized by further comprising another restriction enzyme recognition site on the right side of the left inverted terminal repeat or on the left side of the right inverted terminal repeat of the adenovirus-like genome, thereby facilitating modification and alteration of the adenovirus-like genome.

[Claim 5]

The cosmid vector according to claim 3, characterized in that the E1 and E3 deletion regions have an expression unit for a tetracycline transactivator and an expression unit

for a foreign gene under control of a tetracycline promoter, respectively.

[Claim 6]

A recombinant adenovirus characterized in that the recombinant adenovirus is prepared by digesting the cosmid vector according any one of claims 1 to 4 with restriction enzymes.

[Claim 7]

A recombinant adenovirus prepared from the cosmid vector according to claim 5, characterized in that the expression of the foreign gene under control of the tetracycline promoter can be controlled by tetracycline.

[Claim 8]

An animal cell characterized in that the animal cell is infected with the recombinant adenovirus according to claim 6 or 7.

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Technical Field Pertinent to the Invention]

The present invention relates to a recombinant adenovirus, a cosmid vector having the recombinant viral gene, and an animal cell infected with the recombinant virus. The recombinant adenovirus of the present invention is applicable to therapy for a genetic disease.

[0002]

[Prior Art]

To prepare a recombinant adenovirus, a conventional method requires the steps of proliferating a starting virus, adenovirus (of wild type in usual), in a cultured cell in a large amount, purifying the adenovirus, and extracting DNA from the purified adenovirus. The method further requires a step of performing, in a cultured cell, homologous recombination between the purified viral DNA and a plasmid DNA proliferated in *Escherichia Coli*. Accordingly, when introduction of foreign genes into a plurality of sites of a recombinant adenovirus or modification of a recombinant adenovirus is required, an intermediate virus (a virus in a previous stage to a virus having a desired structure) is prepared and thereafter a purification step of viral DNA thereof must be performed. Thus, the conventional method requires a lot of time and labor.

[0003]

[Problem to be solved by the Invention]

Accordingly, a problem of the invention or an object of the invention is to eliminate not only steps of proliferating and purifying a wild-type or intermediate adenovirus and extracting DNA, which are indispensable steps in a conventional preparation technique for a recombinant adenovirus, but also a step of homologous recombination between the genomic DNA of a purified virus and DNA of a plasmid proliferated in *E. Coli*.

[0004]

[Means for solving the Problems]

Of the present invention, the aforementioned problems are basically solved and the aforementioned object can be simultaneously attained by a cosmid vector characterized by having an adenovirus-like genome containing complete inverted terminal repeats (ITR) at both terminals and the E1 and E3 deletion regions.

[0005]

A cosmid vector of the present invention has restriction enzyme recognition sites for use in isolating only the adenovirus-like genome from the cosmid vector, on both sides of the adenovirus-like genome. In a cosmid vector of the present invention, other restriction enzyme recognition sites for cleaving the vector are present in E1 and E3 deletion regions of the adenovirus-like genome, respectively. These sites can advantageously work in introducing a foreign gene. A cosmid vector of the present invention further has another restriction enzyme recognition site on the right side of the left inverted terminal repeat of the adenovirus-like genome or on the left side of the right inverted terminal repeat. The restriction enzyme recognition site can advantageously work in modifying and altering the adenovirus-like genome.

[0006]

In a cosmid vector of the present invention, expression unit of tetracycline transactivator and an expression unit of a gene under the control of a tetracycline promoter can be introduced, for example, in the E1 and E3 deletion regions.



When the cosmid vector is cleaved with digestion of restriction enzymes to form a structure having inverted terminal repeats at both terminals and DNA having the structure is introduced in an animal cell which permits recombinant adenovirus to proliferate, a recombinant adenovirus of the present invention can be obtained. The recombinant adenovirus is infectious to an animal cell.

[0007]

[Embodiments]

A wild-type adenovirus has a size of about 36,000 base pairs. The recombinant adenovirus vector has substantially the same size. For this reason, the present invention employs a cosmid vector. The technique for proliferating an adenovirus-like genome by use of a cosmid vector while maintaining the genome stably in *E. Coli* is disclosed in JP-A-7-298877 and a method for preparing the recombinant adenovirus is disclosed in the same publication. Then, the present inventors succeeded in isolating an adenovirus-like genome alone from a cosmid vector by stably maintaining an adenovirus-like gene containing complete ITRs at both ends in a different cosmid vector and simultaneously digesting the cosmid vector with restriction enzymes. The isolated adenovirus-like genome containing both terminals completely is introduced into an animal cell, for example, 293 cells, which permit the recombinant adenovirus to proliferate. In this manner, the recombinant adenovirus can be easily obtained. Furthermore, a cosmid vector of the present invention is constructed so as to have a plurality of restriction enzyme

recognition sites in order to facilitate introduction of a foreign gene and modification to the basic skeleton of a recombinant adenovirus.

[0008]

Next, the structure of a cosmid vector of the present invention will be described.

#### Structure of adenovirus-like genome

A cosmid vector of the present invention is constructed of several fragments (as described later) and derived from Ax1cw stemmed from Ax1c (or Ax1w) disclosed in JP-A-7-298877 (Ax1cw is available from the Riken Gene Bank). The cosmid vector newly constructed will be hereinafter referred to as "pacad1A". A schematic structure of pacad1A is shown in FIG. 1. The pacad1A is a plasmid constructed of 6 fragments, more specifically, formed of a base skeleton, fragment 1, to which fragments 2 to 6 are ligated. In manipulating a gene for constructing a recombinant adenovirus, the pacad1A is used by dividing 4 parts. The first part, which is the portion on the left side of the adenovirus-like genome (the region sandwiched by Bs-Bs in FIG. 1), has a complete left ITR and primarily contains a packaging sequence and E1 gene region (from which 1.3 to 9.3% region is deleted and ClaI recognition/digestion site is formed at the deletion site for introducing a foreign gene). The second part, which is the portion on the right side of the adenovirus-like genome (the region sandwiched by E-E in FIG. 1), has a complete right ITR, and primarily contains E3 gene region (from which 79.6 to 84.8% region is deleted and a SwaI recognition/digestion

site is formed at the deletion site for introducing a foreign gene) and E4 gene region. The third part, which is a middle portion of the adenovirus-like genome, corresponds to a viral genome except right and left portions mentioned above. Finally, the fourth part is a portion except for the adenovirus-like genome and corresponds to a charomid portion, a kind of a cosmid vector, in this case. Each of these parts is formed of several fragments or part of a fragment. Table 1 below shows sources from which individual fragments are derived. Pacad1A contains a portion directly derived from Axlcw and a synthetic fragment, which is amplified by a polymerase chain reaction (PCR) using a genomic DNA of AxRSV-LacZ virus (H. Kojima et al., "Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol. 207, pages 8-12 (1995)) as a temperate and a synthetic DNA as a primer.

[0009]

[Table 2]

Fragment No.	Name of restriction enzyme for both terminals of fragment	Source
1	EcoRI and Bst11071	Charomid portion of Axlcw (derived from charomid 9-11)
2	Bst11071 and ClaI	Derived from AxRSV-LacZ (PCR product)
3	ClaI and EcoRI	Viral gene portion of Axlcw
4	EcoRI and SwaI	Derived from AxRSV-LacZ (PCR product)
5	SwaI and KpnI	Viral genome portion of Axlcw
6	KpnI and EcoRI	Derived from AxRSV-LacZ (PCR product)

[0010]

Charomid portion

To solve a problem regarding a structure of a skeleton portion, which is required for proliferating it as a cosmid vector in *E. Coli* and packaging it into  $\lambda$  phage, the present inventors used, as pacad1A, charomid 9-11, which is disclosed by Saito et al. [I. Saito et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 83, pages 8664-8668 (1986)] and from which a polylinker portion (including portions recognized by restriction enzymes EcoRI and HindIII) is previously removed.

[0011]

Structure of boundary region between fragments

The base structures of the boundary regions between fragments constituting pacad1A shown in FIG. 1 are shown in

FIGS. 2 to 7. The boundary region between charomid 9-11 from which the polylinker portion has been removed and the adenovirus-like genome is shown in FIG. 2. As shown in FIG. 2, in the left portion, restriction enzyme recognition sites Hind III, Bst1107I, and PacI, are arranged in this order from the side of charomid to left ITR portion of the adenovirus-like genome. On the other side, in the right side, as shown in FIG. 7, restriction enzyme recognition sites PacI and EcoRI are arranged in this order continuously from the right ITR portion of the adenovirus-like genome to the charomid portion. Since such restriction enzyme recognition sites are arranged in pacad1A used in the present invention, the adenovirus-like genome portion can be isolated as one unit from the charomid portion by digesting with restriction enzyme PacI. Note that when Bst1107I and EcoRI are used, the left and right portions of the adenovirus-like genome can be selectively isolated. Therefore these portions of the adenovirus can be modified or altered by a simple operation.

[0012]

#### Recombination of cosmid vector

To insert or partially replace with a foreign DNA fragment, pacad1A is previously treated with a restriction enzyme(s) (if desired, treated with Klenow fragment or the like), and thereafter, subjected to a ligation reaction together with a DNA fragment to be inserted or replaced. Subsequently, the cosmid DNA is packaged into  $\lambda$  phage using a Gigapack in-vitro packing kit (Stratagene Corp.). In this manner, a recombinant phage is constructed. An appropriate *E. Coli* (DH5 $\alpha$ ) is

infected with the recombinant phage and incubated in LB agar medium containing ampicillin at 37°C overnight. Emergent colonies are individually and separately picked up and incubated in 1.5 ml of LB medium containing ampicillin with shaking at 37°C overnight. DNA derived from the cosmid vector is extracted from the *E. Coli* contained in the LB medium (mini prep operation), and the extracted DNA is digested with an appropriate restriction enzyme(s) to isolate a clone having a desired structure.

[0013]

#### Isolation and purification of adenovirus-like gene

To purify DNA of the clone derived from pacad1A having a desired structure in a large amount, first, the DNA extracted from the 1.5 ml of LB medium is packaged into  $\lambda$  phage by again using the Gigapack in-vitro packaging kit to obtain a recombinant phage. An appropriate *E. Coli* (DH5 $\alpha$ ) is infected with the recombinant phage and incubated in LB medium of an appropriate amount (50 to 200 ml) with shaking at 37°C overnight. From the LB medium, DNA is extracted and purified by use of a QIAGEN column (QIAGEN) or CsCl density gradient ultracentrifugation. An appropriate aliquot is taken from the DNA thus obtained and digested with restriction enzyme PacI (New England Biolabs Inc.). After the digestion with PacI, the sample is treated with phenol/chloroform to remove protein and then centrifuged. To further purify the DNA contained in the supernatant, ethanol precipitation is performed. The precipitate (DNA) is rinsed once with 70% ethanol. The DNA thus rinsed is dissolved in sterile distilled

water. After the concentration of DNA is determined, it is stored in a frozen state until gene introduction operation into an animal cell (293 cell) is performed.

[0014]

Introduction of adenovirus-like genome DNA into 293 cell

First, 600  $\mu$ l of Opti-MEM solution (Gibco Industries Inc.) containing 10  $\mu$ g of the adenovirus-like genome DNA obtained in the aforementioned step and 600  $\mu$ l of Opti-MEM solution containing 80  $\mu$ l of Lipofectamine reagent (Gibco Industries Inc.) are mixed, and then allowed to stand at room temperature for 30 minutes. Thereafter, 7 ml of Opti-MEM solution is further added to the solution mixture. The resultant solution is replaced with a culture solution of 293 cells (available from the ATCC, contained in a flask of 75 cm<sup>2</sup> in area coated with collagen) prepared in advance and incubated at 37°C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere (in a CO<sub>2</sub> incubator). Subsequently, the DNA containing solution-mixture is completely replaced with a fresh cell culture solution and then incubation is performed at 37°C overnight under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere (in a CO<sub>2</sub> incubator). Next day the gene introduction operation is performed, 293 cells are isolated from the flask to obtain a suspension solution, which is then seeded in a 96-well plate coated with collagen to allow recombinant viral cells to emerge and proliferate.

[0015]

Isolation of recombinant adenovirus

Generally, when 293 cells are maintained for 14 days after the gene introduction operation, cytopathic effect can

be observed, which is a phenomenon where a recombinant adenovirus newly produced proliferates in 293 cells and kills 293 cells. Based on the phenomenon, the well having viruses generated therein can be distinguished. Dead cells containing viruses and the culture solution were taken from the well and stored in a frozen state. Fresh 293 cells are infected with an aliquot of the stored solution and genomic DNA is extracted from the dead cells. The obtained DNA is digested with several restriction enzymes and subjected to agarose gel electrophoresis to confirm the digestion pattern. In the manner mentioned above, a virus clone having a desired structure is proliferated in a large amount and then purified.

[0016]

#### Features of the invention

The features of the present invention will be distinguishably described in comparison with a conventional method.

(1) Although a recombinant adenovirus is produced depending upon homologous recombination between different two types of DNA molecules in a 293 cell in a conventional method, the present invention does not require this step.

(2) Therefore, the possibility that the emergent recombinant adenovirus thus produced has a structure other than a desired one is extremely low.

(3) Since one of the two types of DNA molecules is one extracted from virus particles proliferated in a large amount and purified in a conventional method, the preparation of such DNA molecule requires relatively much time and labor



as well as specific equipment and machines in a conventional method. However, in the present invention, since *pacad1A* and its derivative are present in the form of a cosmid vector, only a proliferation step in *E. Coli* is required. Therefore, a large amount of recombinant adenovirus can be prepared simply and easily.

~~----- (4) Since *pacad1A* has the form of a cosmid vector, it~~  
is possible to maintain the adenovirus-like genome stably in  $\lambda$  phage and *E coli*.

(5) Various recognition sites of restriction enzymes (*ClaI*, *Bst1107I*, *XbaI*, *BamHI*, *EcoRI*, *SwaI* and *KpnI*, see FIG. 1) are prepared in the adenovirus-like genome within *pacad1A* in order to simply perform a complicated operation required for modifying the genome, so that they can be used in constructing a new generation of recombinant adenovirus vector and a recombinant adenovirus vector complicated in function.

[0028]

[Advantages of the Invention]

Use of a cosmid vector having an adenovirus-like genome of the present invention makes it possible to simplify operations such as modification and alteration of an adenoviral gene and introduction of a foreign gene into an adenoviral gene, although a conventional method requires complicated operations that are applied to a plurality of sites. In addition, since an adenovirus and genomic DNA thereof must not be prepared in a large amount, time and labor can be greatly reduced.

[Brief Description of the Drawings]

[FIG. 1]

A schematic illustration showing a structure of a recombinant cosmid vector, *pacad1A*, used in the present invention, where

-----E1 is a deletion site of early region 1 of an adenovirus;-----

E3 is a deletion site of early region 3 of adenovirus;

COS is a requisite portion in packaging the cosmid vector into  $\lambda$  phase;

Ori is a replication origin of a plasmid in *E. Coli*, at which amplification of the cosmid vector is started;

Amp<sup>r</sup> is a gene imparting resistance against an antibiotic, ampicillin, to *E. Coli* transformed by the cosmid vector;

ITR is an inverted terminal repeat present at both terminals of an adenoviral genome;

Bs is a cleavage site recognized by restriction enzyme Bst1107I;

P is a cleavage site recognized by restriction enzyme PacI;

C is a cleavage site recognized by restriction enzyme ClaI;

X is a cleavage site recognized by restriction enzyme XbaI;

B is a cleavage site recognized by restriction enzyme BamHI;

E is a cleavage site recognized by restriction enzyme EcoRI;

S is a cleavage site recognized by restriction enzyme  
SwaI;

K is a cleavage site recognized by restriction enzyme  
KpnI;

*C, X, B and S* (written in italics) means that the cleavage  
site recognized by the corresponding enzyme is the only one.

-----[FIG. 2]-----

An illustration of a base sequence of the boundary portion  
A between fragments 1 and 2 constituting the cosmid vector  
pacad1A shown in FIG. 1 and restriction enzymes, which can  
recognize the base sequence of the boundary region and digest  
the vector.

[FIG. 3]

An illustration of a base sequence of the boundary portion  
B between fragments 2 and 3 constituting the cosmid vector  
pacad1A shown in FIG. 1 and restriction enzymes, which can  
recognize the base sequence of the boundary region and digest  
the vector.

[FIG. 4]

An illustration of a base sequence of the boundary portion  
C between fragments 3 and 4 constituting the cosmid vector  
pacad1A shown in FIG. 1 and restriction enzymes, which can  
recognize the base sequence of the boundary region and digest  
the vector.

[FIG. 5]

An illustration of a base sequence of the boundary portion  
D between fragments 4 and 5 constituting the cosmid vector  
pacad1A shown in FIG. 1 and restriction enzymes, which can

recognize the base sequence of the boundary region and digest the vector.

[FIG. 6]

An illustration of a base sequence of the boundary portion E between fragments 5 and 6 constituting the cosmid vector pacad1A shown in FIG. 1 and restriction enzymes, which can

recognize the base sequence of the boundary region and digest the vector.

[FIG. 7]

An illustration of a base sequence of the boundary portion F between fragments 6 and 7 constituting the cosmid vector pacad1A shown in FIG. 1 and restriction enzymes, which can recognize the base sequence of the boundary region and digest the vector.

[FIG. 8]

An illustration showing a recombinant adenovirus in which the expression of a gene is controlled by tetracycline in a single vector, infection of an animal cell with the virus; and expression of the virus in an animal cell by culturing

[FIG. 9]

An agarose gel electrophoresis pattern of a DNA derived recombinant adenoviruses of 16 wells obtained in gene introduction Example A and digested with SphI, where M is a marker lane and DNA sizes (the number of base pairs) indicated by the marker are shown at the left-hand side of the pattern.

[FIG. 10]

An illustration showing a cleavage pattern of DNA of a recombinant adenovirus gene (estimated as AcNTT-luc)

digested with SphI, where reference numerals indicate the sizes (the number of base pairs) of DNA fragments separated by digestion with SphI.

---

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images  
problems checked, please do not report the  
problems to the IFW Image Problem Mailbox**